

終了年月 ; 2007 年 3 月 22 日

専攻・コース名 ; 先端生命科学専攻

氏名 ; 須永和子

学生証番号 ; 47-56526

論文題目 ; マウス卵成長過程における母性 mRNA の機能解析法の確立

キーワード ; 母性 mRNA、growing oocyte、follicle、*in vitro* growth、RNAi、siRNA

指導教員名 ; 青木不学

指導教員役職 ; 助教授

マウス成長過程における母性 mRNA の機能解析法の確立

学生証番号 56526

資源生物制御学分野 須永和子

指導教員 青木不学

【序論】

生殖細胞は体を形成している細胞のうちで唯一、受精を通じて再び次の世代を作り出すことのできる細胞である。マウスの卵形成過程では、胎児期の卵巣内において始原生殖細胞の活発な分裂が起こり、出生後、その細胞周期を第一減数分裂前期で停止して成長していく。そして成長後に再び減数分裂を開始し(卵成熟)、第二減数分裂中期で受精を待つ。この成長する過程を卵成長過程 (oocyte growth) といい、この過程では、成長期卵 (growing oocyte ; GO) は顆粒膜細胞、莢膜細胞との複合体である卵胞 (follicle) を形成している。GO 中では、卵特異的な遺伝子の転写が活発に起こるが、その後転写活性は次第に低くなり、成長卵 (fully grown oocyte ; FGO) では転写活性が全く見られなくなる。しかし、FGO 中にはそれまでに合成された mRNA (母性 mRNA) が非常に安定して蓄積されており、この蓄積された母性 mRNA が卵成熟や受精後の発生に機能することが知られている(図 1)。しかしながら一方で、多くの母性 mRNA について、それらの時期での機能は未解明となっている。母性 mRNA の機能解析法として、conditional knockout mouse や 2 本鎖 RNA を発現する transgenic mouse を作成する方法があるが、これらは作成に多大な時間と労力を要し、さらに表現型が安定して得られないなどの問題がある。そこで本研究では、従来の方法よりもより簡便に、そして効率的な母性 mRNA の機能解析法の確立を目的として、siRNA を follicle 中の GO に microinjection した後 *in vitro* で培養し、卵成長、成熟期を経て受精後の初期発生期における特定の母性 mRNA の機能を解析する手法の確立を試みた。

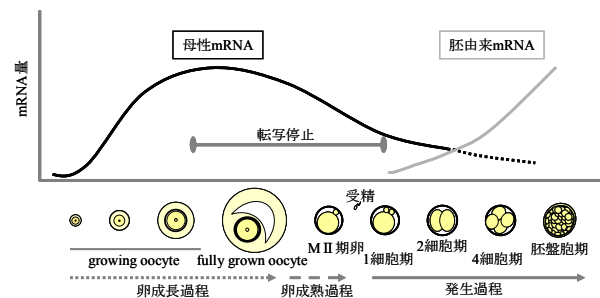


図 1. 卵成長過程から発生過程までの概略とその期間における mRNA 量の変化

【結果と考察】

1. *in vitro* における卵成長 (*in vitro growth* ; IVG) のための条件検討

まず、*in vitro growth* において、より高い割合で follicle を発達させ、その後続く卵成熟、受精、初期発生まで至ることが必要であると考え、条件検討を行った。これまでの報告により、1 個の卵巣から多数の GO が回収されてくるが、GO のサイズには大きな差異があり、また GO のサイズにより減数分裂への進行能力や発生能力に違いがあることがわかっている。そこで実際に、培養する follicle を回収するマウスの日齢、その培養期間、培養開始時における follicle や GO の直径を検討した。その結果、より高い割合で follicle を発達させ、かつ発達した follicle 中の FGO を卵成熟させることのできた条件は、12 日齢マウス由来の follicle であつ、培養開始時に follicle の直径が 100-125 μm 、GO の直径が 50-65 μm のもの、また *in vitro* での培養期間は 12 日間であることがわかった。(図 2)。また、*in vivo*

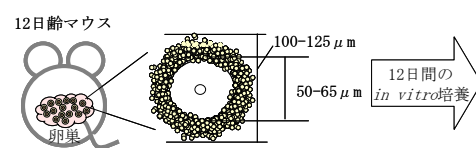


図 2. 本研究にて決定した IVG の最適条件

で成長した後の FGO が *in vitro* で成長したものと性質に違いがあるかどうかを確認するために、核相を DNA 染色で、そして蓄積している *c-mos* の母性 mRNA 量を real-time PCR で調べたところ、両者に有意な差は見られなかった。また、受精率および受精後の 2 細胞期の発生率についてはこの両者に違いはみられなかったが、胚盤胞に至る割合は有意に差が見られた (*in vivo* growth ; *in vitro* growth=70.6:36.9%)。このことから、母性 mRNA の機能について卵成熟、そして受精後の 2 細胞期までの発生における解析が可能であることがわかった。また、2 細胞期から胚盤胞期までの発生については今後の検討が必要であると考えられる。

2. siRNA による卵成長過程に蓄積される母性 mRNA の機能解析法確立の検証

siRNA を導入するための方法として、transfection 試薬を用いた手法が一般的であるが、周りを granulosa cell で囲まれた GO では、この手法による母性 mRNA の機能解析には不適切であると考えられるので、GO の細胞質に直接 microinjection することが可能かどうか、またその後の follicle の発達に影響はないかどうかを eGFP mRNA を用いて検討した。eGFP mRNA を microinjection したものでは、GO の細胞質に 90%以上の割合で EGFP の発現が観察された。したがって GO に高い割合で microinjection が行える事がわかった。さらに、microinjection していないもの (uninjected) と microinjection したものと間で follicle の発達率に差は無く、microinjection による培養への影響がないことが示された。次に、follicle 中の GO の細胞質に siRNA を microinjection し、卵成長過程に蓄積される母性 mRNA の機能解析が可能であるかどうかを検証した。検証には、母性 mRNA が卵成長過程において蓄積し、卵成熟過程において翻訳され、またノックダウンした際に単為発生が起こるといった表現型が知られている *c-mos* 遺伝子に対する siRNA を用いた。microinjection 後、12 日間の培養期間における follicle の発達率、その後の排卵率は、uninjected のもの、eGFP siRNA を microinjection したものの、*c-mos* siRNA を microinjection したものの間に有意な差は見られなかった。続いて、*in vitro* で 12 日間培養後、FGO 中の母性 *c-mos* mRNA の蓄積量について real-time PCR にて解析した。その結果、*c-mos* siRNA を microinjection した FGO でのみ特異的に *c-mos* mRNA 蓄積量が大幅に減少していた (図 3)。加えて、*in vitro* で排卵させた MII 期卵を 24 時間培養しその表現型を確認したところ、*c-mos* siRNA を microinjection した MII 期卵でのみ多く単為発生している卵がみられた (図 4)。したがって、siRNA が特異的に mRNA の機能を抑制し、12 日間の培養後においても、その効果が検出できることがわかった。

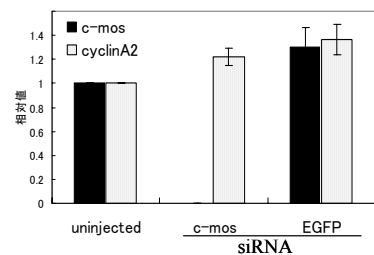


図 3. microinjection し *in vitro* で培養後の *c-mos*、*cyclinA2* の mRNA 蓄積量の違い

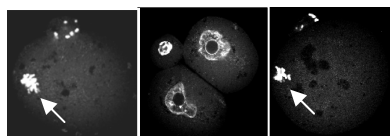
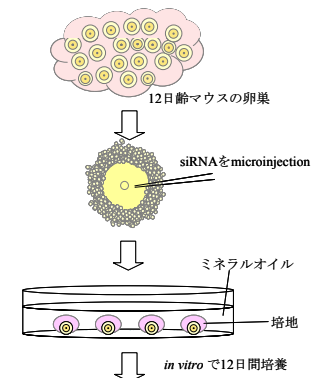


図 4. 左 uninjected、中央 *c-mos* siRNA、右 eGFP siRNA。中央の卵でのみ、2 細胞期への単為発生が見られた矢印は染色体を示す。

以上により、本研究にて確立した母性 mRNA の機能解析法 (図 5) により、卵成長期、卵成熟期、受精後の初期発生期における母性 mRNA の機能を解析できる可能性が示された。



母性 mRNA の機能について解析する
図 5. 母性 mRNA の機能解析法